

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets⁴ : C12M 1/18	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 86/ 07376 (43) Date de publication internationale: 18 décembre 1986 (18.12.86)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR86/00195 (22) Date de dépôt international: 6 juin 1986 (06.06.86) (31) Numéro de la demande prioritaire: 85/08555 (32) Date de priorité: 6 juin 1985 (06.06.85) (33) Pays de priorité: FR (71) Déposant: INSTITUT FRANÇAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT EN COOPERATION (ORSTOM) [FR/FR]; 24, rue Bayard, F-75008 Paris (FR). (72) Inventeurs: RAIMBAULT, Maurice ; 6, hameau de la Frégate, Port Sud, F-91650 Breuillet (FR). ROUSSOS, Sevastianos ; 2, rue Gay Lussac, F-91610 Ballancourt (FR).		(74) Mandataire: AHNER, Francis; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CH (brevet européen), CM (brevet OAPI), DE (brevet européen), FR (brevet européen), GA (brevet OAPI), GB (brevet européen), IT (brevet européen), LU (brevet européen), ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), NL (brevet européen), SE (brevet européen), SN (brevet OAPI), TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING SPORES OF FILAMENTOUS MUSHROOMS (54) Titre: PROCEDE DE PRODUCTION DE SPORES DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX (57) Abstract Method for producing spores of filamentous mushrooms, characterized in that it implies the implementation in a fermentation container provided with rotary discs, of various successive particular operations. (57) Abrégé Procédé de production de spores de champignons filamenteux, caractérisé en ce qu'il implique la mise en oeuvre dans un fermenteur à disques rotatifs, de différentes opérations particulières successives.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GA	Gabon	MR	Mauritanie
AU	Australie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BB	Barbade	HU	Hongrie	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	IT	Italie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	JP	Japon	RO	Roumanie
BR	Brésil	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CH	Suisse	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	ML	Mali		
FR	France				

PROCEDE DE PRODUCTION DE SPORES DE
CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

La présente invention concerne un procédé de production de spores de champignons filamenteux.

L'utilisation des champignons filamenteux est très répandue dans des domaines aussi variés que les fermentations alimentaires, l'industrie pharmaceutique et la production d'enzymes ou de molécules biologiques par biosynthèse ou hémisynthèse.

Les spores de champignons filamenteux sont la forme de résistance et de reproduction de ces microorganismes. Ces spores constituent le point de départ de toutes ces applications puisqu'elles peuvent servir de forme de conservation et de lancement de l'opération, mais également intervenir de façon massive dans le processus lui-même soit en tant qu'inoculum ou en tant que spores elles-mêmes pour réaliser les transformations de bio-conversion attendues.

Différentes techniques sont connues pour la production de ces spores. La plus ancienne, mais la plus artisanale consiste à cultiver l'organisme à la surface d'un milieu gélosé soit en boîte de Pétri au laboratoire, soit en fioles de Roux pour les applications pratiques. Cette technique quoique sûre, puisqu'une aseptic complète peut être réalisée, pose de graves problèmes de récolte des spores et de manipulation d'un nombre important de fioles lorsque la quantité désirée s'élève quelque peu. C'est la raison pour laquelle une telle pratique ne peut rester qu'artisanale et ne trouver d'application que dans des cas particuliers.

La technique de production de spores en plateaux fait appel à la culture du champignon sur des substrats végétaux tels que son de blé, paille et divers produits ou résidus amylacés disposés en couche de quelques centimètres d'épaisseur et placées dans des étuves d'incubation. Des dispositifs automatiques complexes de chargement et déchargement des plateaux ont

été proposés. Toutefois, il reste que le produit obtenu est constitué non pas de spores pures, mais d'un mélange de spores, de mycelium du champignon et des résidus végétaux. D'autre part, le maintien des conditions
5 aseptiques est très délicat. La récolte des spores, la contamination ambiante et la variabilité de l'organisme sont des inconvénients majeurs.

Plus récemment on a montré la possibilité de produire des spores de champignons dans des cultures liquides en utilisant des fermenteurs stérilisables. Il
10 s'agit sans doute d'un progrès réel, mais cela n'est possible que dans des conditions particulières et avec un nombre limité de champignons. D'autre part, la suspension recueillie contient non seulement les spores,
15 mais également une quantité importante de métabolites et tous les débris cellulaires qui peuvent être gênants. Enfin, le maintien des conditions d'aération efficace du milieu liquide pendant de longues périodes d'incubation entraînent des dépenses d'énergie coûteuses.

20 Par ailleurs, parmi les nombreux dispositifs de fermenteur qui ont été proposés pour la culture des microorganismes en milieu liquide, on trouve des fermenteurs à disques rotatifs, dont le principe d'utilisation est basé essentiellement sur la rotation permanente
25 des disques tout au long de l'incubation et qui plongent alternativement dans le milieu nutritif liquide et dans l'atmosphère.

La présente invention concerne un procédé de production de spores de champignons filamenteux, caractérisé en ce qu'il implique la mise en oeuvre, dans
30 un fermenteur à disques rotatifs, des opérations successives suivantes :

- a) on ajoute un agent de solidification dans un milieu de culture contenant au moins un substrat de croissance ainsi que des agents de culture;
- 35

- b) on dispose ce milieu de culture sur les disques rotatifs dans le fermenteur ;
- c) on stérilise l'ensemble du fermenteur;
- d) on refroidit le milieu de culture à une température restant supérieure au point de solidification dudit milieu;
- e) on inocule ledit milieu de culture avec des spores de champignons filamenteux;
- f) on homogénéise ledit milieu de culture par rotation lente des disques du fermenteur;
- g) tout en maintenant une rotation lente des disques du fermenteur, on solidifie le milieu absorbé sur les disques rotatifs par abaissement brusque de la température du fermenteur ;
- h) après immobilisation des disques rotatifs, on laisse incuber le milieu inoculé en assurant dans le fermenteur une circulation d'air stérile, d'humidité et de température contrôlées, pendant le temps nécessaire à la maturation des conidies, et
- i) après développement uniforme des spores à la surface des disques du fermenteur, on sépare et on récolte les spores par balayage des disques animés d'un mouvement de rotation rapide, à l'aide d'un fluide contenant de préférence un agent tensio-actif et/ou des billes calibrées, la biomasse mycélienne restant emprisonnée dans le milieu de culture solidifié qui reste fixé sur les disques du fermenteur.

La présente invention concerne aussi le dispositif nécessaire à la mise en oeuvre du procédé décrit ci-dessus; il s'agit d'un fermenteur à disques rotatifs, pourvu de systèmes de régulation de la température et de l'humidité, et d'un moteur permettant la mise en rotation de l'axe supportant l'empilement des disques.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture de la des-

cription détaillée faite ci-après, notamment en regard de la figure annexée qui illustre un mode de réalisation particulier du dispositif nécessaire à la mise en oeuvre du procédé de l'invention.

5 Ce nouveau procédé pour la production de spores de champignons filamenteux allie l'avantage de la culture de surface sur un milieu solidifié, qui reste la technique la plus sûre et la plus générale de sporulation, avec l'utilisation d'un fermenteur à disques ro-
10 tatifs particulier dont le principe d'utilisation a été fondamentalement modifié de façon à obtenir une grande surface de sporulation et permettant en particulier de récolter aisément uniquement les spores par simple lavage des surfaces, la biomasse mycélienne restant empri-
15 sonnée dans le milieu solidifié. Toutes les opérations peuvent être réalisées dans le même appareil stérilisable, assurant une grande simplicité et une asepticité stricte.

Le principe de ce procédé est basé sur le fait
20 que le milieu de culture nutritif contenant le ou les substrats de croissance et les agents de cultures est additionné d'un agent de solidification, par exemple de la gélose. Après stérilisation, le milieu est refroidi et sa température est maintenue au-dessus du point de
25 solidification, par exemple 50°C. L'inoculum de spores est alors ajouté et une rotation lente des disques permet d'homogénéiser le milieu.

Tout en maintenant une lente rotation des disques, l'atmosphère est brutalement refroidie de façon
30 à permettre la solidification du milieu à la surface des disques.

Lorsque le milieu de culture est réparti sur les disques, la rotation est stoppée et la température du dispositif est amenée à la température d'incubation.
35 Un flux d'air stérile, d'humidité et de température contrôlés

est maintenu pendant toute la période d'incubation de façon à maintenir les conditions favorables de développement du champignon. Notons que pendant cette incubation aucune agitation mécanique n'est nécessaire.

5 L'organisme se développe ainsi uniformément dans toute la masse du milieu solidifié. Après 1 à 2 jours les surfaces libres sont recouvertes d'un tapis homogène de filaments aériens. Suivant l'organisme utilisé la sporulation se produit après 2 à 3 jours d'une
10 façon très régulière et synchrone sur toutes les surfaces disponibles. Les spores contenues dans les têtes conidiennes aériennes se trouvent ainsi à l'extérieur des disques (5), alors que le mycelium végétatif reste emprisonné dans le milieu solidifié (6). L'incubation
15 peut être poursuivie jusqu'à 7 à 10 jours pour permettre la maturation des têtes conidiennes.

La récolte des spores peut alors être faite de façon particulièrement aisée en introduisant dans le fermenteur un volume d'eau stérile additionné d'un
20 agent tensio-actif, par exemple du TWEEN 80[®] et en maintenant une rotation rapide des disques pendant 10 minutes environ.

Ceci permet un lavage très efficace des surfaces des disques provoquant la mise en suspension des
25 spores à l'exclusion de la biomasse mycélienne et de la majorité des métabolites qui sont fortement fixées à l'intérieur du milieu gélosé. Plusieurs lavages successifs peuvent être pratiqués. Les spores peuvent alors être centrifugées ou décantées, lavées, et séchées par
30 évaporation sous vide, lyophilisation ou atomisation.

Selon un autre mode de récolte possible, on peut introduire des billes calibrées d'un diamètre inférieur à la distance interface des disques pour favoriser la dispersion des spores dans l'atmosphère. Les
35 spores sont alors récoltées à sec grâce à la rotation

des disques couplée à un balayage d'air stérile suffisamment élevé pour créer des turbulences et entraîner les spores qui sont alors récoltées grâce à un dispositif de filtration de l'air à la sortie du fermenteur.

5 Lorsque les spores ont été récoltées, le lavage du fermenteur est réalisé en introduisant un liquide détergent à chaud qui, couplé à une agitation rapide, provoque la fusion du milieu, la stérilisation de la biomasse résiduelle et le nettoyage du dispositif.

10 Selon un mode préféré de mise en oeuvre du procédé, le réacteur décrit sur la figure 1 est de forme cylindrique et réalisé en matériaux pouvant supporter la stérilisation. Le fermenteur est constitué d'une cuve cylindrique 1 munie à une extrémité d'une platine
15 2, munie d'un axe rotatif 3 supportant un empilement de disques rigides 4 d'un diamètre légèrement inférieur au diamètre interne de la cuve. La matière, l'épaisseur et la surface des disques peuvent être quelconques, pourvu qu'ils permettent une bonne rétention et une réparti-
20 tion homogène du milieu au cours de la rotation et de la phase de solidification. Ces disques 4 peuvent être constitués simplement par une ou deux grilles d'acier de quelques mm d'épaisseur et de maille de 2 à 5 mm. L'espacement et la disposition de ces grilles peuvent
25 être variables. Dans la figure 1 décrivant un exemple de mise en oeuvre de ce dispositif, les disques sont constitués de deux grilles d'acier de 2 mm d'épaisseur espacées de 2 mm de telle sorte qu'après répartition et solidification du milieu, on obtienne un disque de 6 mm
30 d'épaisseur. Dans un mode préféré de mise en oeuvre, l'espacement entre les disques gélosés est de 10 mm.

Un balayage forcé du réacteur par un flux d'air stérile humidifié par barbotage doit être prévu par une entrée haute (7) et une sortie basse (8) qui
35 permettent également le remplissage et la vidange du

réacteur. Des dispositifs de contrôle et de régulation de la température, de l'humidité relative et de la composition de l'atmosphère du réacteur peuvent se révéler utiles.

- 5 Le réacteur tel qu'il vient d'être décrit a été utilisé pour la mise en oeuvre de l'invention sous forme d'un réacteur de 1500 cm^3 muni de 10 plateaux de 5 mm représentant une surface libre de 1270 cm^2 .

- Les essais ont porté sur la production de
10 spores de champignons appartenant aux genres *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*. En l'occurrence une souche d'*Aspergillus hennebergii* du groupe A. niger et une souche de *Penicillium* isolée au laboratoire ont été choisies pour représenter les genres *Aspergillus* et
15 *Penicillium*. Deux souches de collection internationale, *Trichoderma harzianum* CCM-F-470 et *Penicillium camembertii* CCM-F-378 ont été choisies pour représenter les genres *Trichoderma* et *Penicillium*.

- Dans un exemple de mise en oeuvre préféré du
20 procédé, le milieu de culture est composé pour un litre d'eau de 100 g de farine de manioc, de 4 g de KH_2PO_4 , de 8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, de 2 g d'urée et de 20 g d'Agar. 300 ml de ce milieu sont introduits dans le réacteur qui est alors stérilisé à 120°C pendant 30 minutes.
25 Le dispositif est alors refroidi et lorsque la température du milieu est de 50°C l'inoculum de spores est introduit stérilement. Le milieu est alors homogénéisé par une rotation des disques à raison de 60 t/mn pendant quelques minutes. Après homogénéisation, un courant
30 d'air stérile et froid à raison de 200 l/h permet la solidification du milieu de culture sur les grilles et la constitution des disques de milieu. Après 30 minutes, la rotation est stoppée et le fermenteur est aéré par un débit de 10 litres/h d'air stérile saturé d'eau à la temp
35 rature d'incubation, qui peut être de 30°C , mais varie

avec l'organisme cultivé.

Après 7 jours, la récolte des spores est réalisée en introduisant dans le fermenteur 500 ml d'eau stérile contenant quelques gouttes de TWEEN 80. L'aération est stoppée et la rotation des disques à 100-
5 200 t/mn est maintenue pendant 10 minutes. La suspension de spores est alors recueillie, et le nombre de spores est calculé par un comptage microscopique direct sur une cellule de Malassez après une dilution adéquate.
10 Deux lavages supplémentaires utilisant 250 ml d'eau sont réalisés. La suspension de spores est alors décantée et, après élimination du surnageant, une poudre sèche de spores est obtenue par évaporation sous vide de la suspension concentrée. Cette poudre de spores permet
15 une remise en suspension aisée des spores pour leur utilisation, sans phénomènes tensio-actifs gênants.

Le tableau I indique les résultats obtenus pour quatre souches de champignons. On constate que le premier lavage permet de récolter 75 à 90 % des spores
20 contenues dans le dispositif et d'obtenir des suspensions de spores concentrées contenant au moins $1,1 \times 10^8$ à $4,2 \times 10^8$ spores par ml.

La quantité de spores formée par cm^2 varie de 3×10^7 à $2,2 \times 10^8$ spores/ cm^2 . Le rendement pondé-
25 ral en spores rapporté à la quantité de substrat introduite dans le fermenteur varie de 5 à 14 %, ce qui représente un taux de conversion en spores important.

Compte tenu de ce qui précède, la présente invention permet de produire des spores de champignons
30 en conditions aseptiques et selon une technique relativement simple, d'une mise en oeuvre aisée ne nécessitant pas de manipulations longues et coûteuses. Elle permet également d'éviter tous risques de contamination de l'environnement. D'autre part, la présente invention
35 est caractérisée par le fait que l'on obtient des spores

pures sans contamination par d'autres microorganismes ni par des métabolites ou résidus mycéliens qui sont retenus essentiellement dans le dispositif lors de la récolte. Les rendements obtenus sont supérieurs.

- 5 ou comparables à ce que l'on peut obtenir par les autres techniques habituelles d'une mise en oeuvre délicate. Enfin cette invention est caractérisée par le faible encombrement des matériels en fonction des quantités de spores obtenues.

TABLEAU I

	<u>Aspergillus</u> <u>niger</u> (henebergii)	<u>Trichoderma</u> <u>harzianum</u>	<u>Penicillium</u> <u>sp</u>	<u>Penicillium</u> <u>camembertii</u>
1er lavage, 500 ml	75 %	76 %	87 %	92 %
2ème lavage, 250 ml	15 %	24 %	11 %	6 %
3ème lavage, 250 ml	10 %	5 %	2 %	2 %
Nombre de spores récoltées dans 1 l	$7,3 \times 10^{10}$	$2,8 \times 10^{11}$	$1,5 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^{10}$
Concentration 1è	$1,1 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$
2è	$4,3 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	$6,6 \times 10^7$	$9,1 \times 10^6$
3è	$3,0 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^4$	$3,0 \times 10^6$
Nombre de spores formées par cm ²	$5,75 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$3,0 \times 10^7$
Nombre de spores par g de substrat	$2,5 \times 10^9$	$9,3 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$	$1,25 \times 10^9$
Poids de 1 spore (g)	$6,0 \times 10^{-11}$	$1,3 \times 10^{-11}$	$1,1 \times 10^{-11}$	$4,0 \times 10^{-11}$
Rendement pondéral global rapporté au substrat carboné, poids spores/g	14,6 %	12,1 %	5,75 %	5 %

- REVENDICATIONS -

- 1 - Procédé de production de spores de champignons filamenteux, caractérisé en ce qu'il implique la mise en oeuvre, dans un fermenteur à disques rotatifs, des opérations successives suivantes :
- a) on ajoute un agent de solidification dans un milieu de culture contenant au moins un substrat de croissance ainsi que des agents de culture;
 - b) on dispose ce milieu de culture sur les disques rotatifs dans le fermenteur ;
 - c) on stérilise l'ensemble du fermenteur;
 - d) on refroidit le milieu de culture à une température restant supérieure au point de solidification dudit milieu;
 - e) on inocule ledit milieu de culture avec des spores de champignons filamenteux;
 - f) on homogénéise ledit milieu de culture par rotation lente des disques du fermenteur;
 - g) tout en maintenant une rotation lente des disques du fermenteur, on solidifie le milieu par abaissement brusque de la température du fermenteur, ce qui a pour effet de répartir le milieu sur les disques;
 - h) après immobilisation des disques rotatifs, on laisse incuber le milieu inoculé en assurant dans le fermenteur une circulation d'air, d'humidité et de température contrôlées, pendant le temps nécessaire à la maturation des conidies, et
 - i) après développement uniforme des spores à la surface des disques du fermenteur, on sépare et on récolte les spores par balayage des disques animés d'un mouvement de rotation rapide, à l'aide d'un fluide contenant de préférence un agent tensio-actif et/ou des billes calibrées, la biomasse mycélienne restant emprisonnée dans le milieu de culture solidifié qui reste fixé sur les disques du fermenteur.

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est appliqué à la production de spores de champignons dont la forme de reproduction est constituée par des conidies.

5 3 - Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il est appliqué à la production de spores de champignons appartenant aux genres *Aspergillus*, tel que *Aspergillus niger*, *Trichoderma*, tel que *Trichoderma harzianum* ou *Penicillium*, tel que *Penicillium camembertii*.
10

4 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les agents de culture sont constitués d'une source de carbone, telle que l'amidon, d'une source d'azote, telle qu'un mélange de sulfate
15 d'ammonium et d'urée, d'une source de phosphore et d'autres composés minéraux ou organiques.

5 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'agent de solidification ajouté au cours de l'étape a) est de la gélose.

20 6 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le fluide de lavage utilisé au cours de l'étape i) est de l'eau stérile, additionnée d'un agent tensio-actif tel que du TWEEN 80.

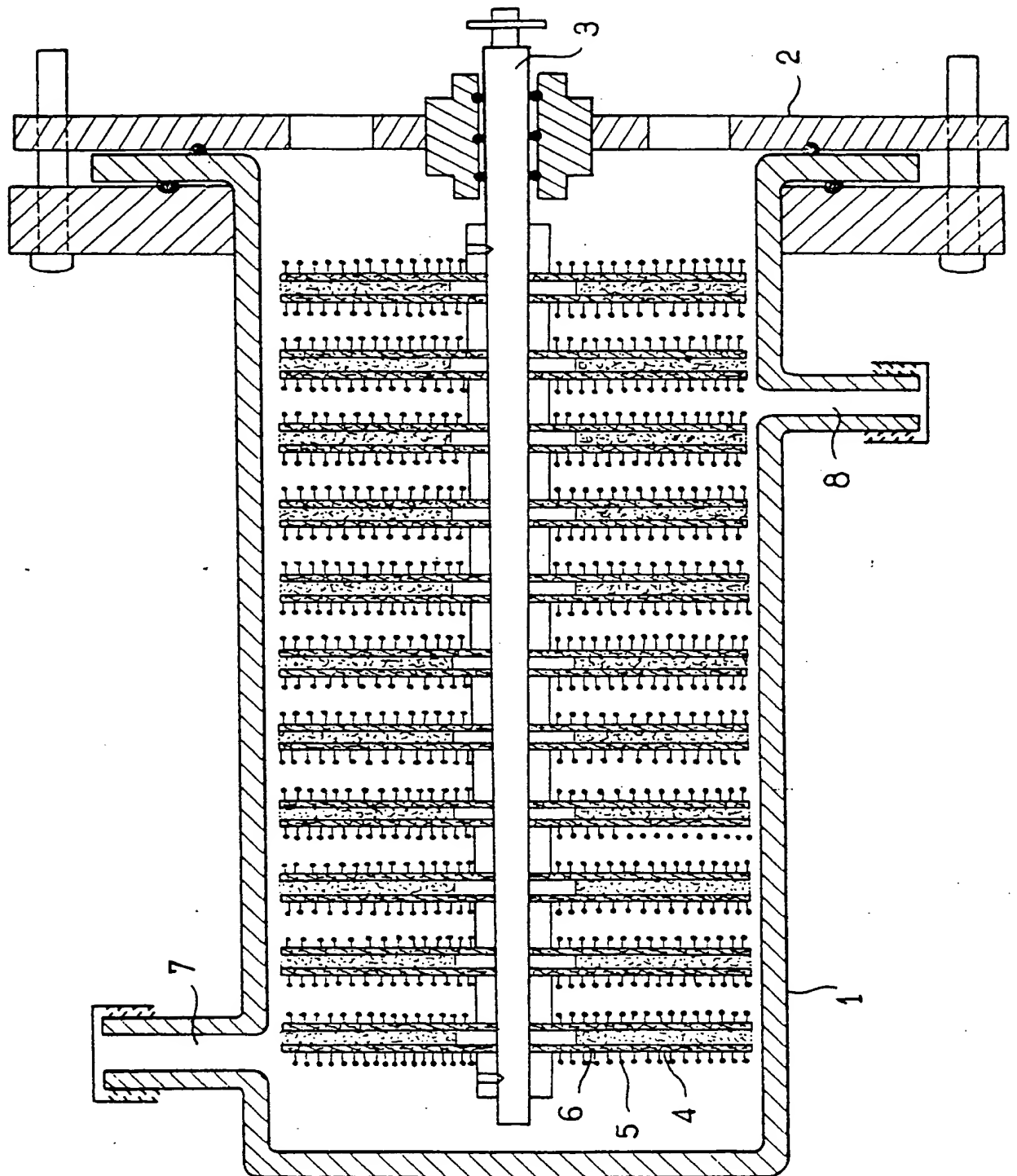
25 7 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les billes calibrées utilisées au cours de l'étape i) ont un diamètre inférieur à la distance interface des disques.

8 - Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la suspension des spores
30 récoltées est concentrée par centrifugation ou décantation, lavée puis séchée par évaporation sous vide, lyophilisation ou atomisation.

9 - Dispositif pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé
35 en ce qu'il se présente sous la forme d'un fermenteur à

disques rotatifs, pourvu de systèmes de régulation de la température et de l'humidité, et d'un moteur permettant la mise en rotation de l'axe supportant l'empilement des disques, disques dont au moins une surface est
5 constituée par une grille ayant une ouverture de maille de 2 à 5 mm.

1 / 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 86/00195

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. ⁴ C 12 M 1/18		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched *		
Classification System	Classification Symbols	
Int. Cl. ⁴	C 12 M; C 12 N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	FR, A, 2044588 (GLAVNOE UPRAVLENIE PO PROIZVODSTVU BAKTERIINYKH I VIRUSNYKH PREPARATOV MINISTERSTVA ZDRAVOOKHRANENIA) 19 February 1971, see figs.; claim 1; page 4, line 10 - page 6, line 10	1,9
Y	GB, A, 1581832 (THE UNIVERSITY OF STRATHCLYDE) 31 December 1980, see figs.; claims	1,9
Y	FR, A, 373828 (G.J. BURMANN et al.) 28 May 1907, see figs. abstract; page 1, line 52	1,9
A	FR, A, 2486097 (EXPERIMENTALNY ZAVOD BIOKHMICHESKIKH PREPARATOV) 8 January 1982, see claims; example	2,5

<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
30 July 1986 (30.07.86)	28 August 1986 (28.08.86)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/FR 86/00195 (SA 13419)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 13/08/86

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A- 2044588	19/02/71	None	
GB-A- 1581832	31/12/80	None	
FR-A- 373828		None	
FR-A- 2486097	08/01/82	JP-A- 56169591	26/12/81
		DE-A,C 3115516	11/02/82
		GB-A,B 2076018	25/11/81
		US-A- 4380583	19/04/83

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N° PCT/FR 86/00195

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷ Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB ⁴ : C 12 M 1/18		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ <div style="text-align: right; font-size: small;">Documentation minimale consultée ⁸</div>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁴	C 12 M; C 12 N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie *	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
Y	FR, A, 2044588 (GLAVNOE UPRAVLENIE PO PROIZVODSTVU BAKTERIINYKH I VIRUSNYKH PREPARATOV MINISTERSTVA ZDRAVOOKHRA-NENIA) 19 février 1971, voir figures; revendication 1; page 4, ligne 10 - page 6, ligne 10 --	1,9
Y	GB, A, 1581832 (THE UNIVERSITY OF STRATHCLYDE) 31 décembre 1980, voir figures; revendications --	1,9
Y	FR, A, 373828 (G.J. BURMANN et al.) 28 mai 1907, voir figures; résumé; page 1, ligne 52 --	1,9
A	FR, A, 2486097 (EXPERIMENTALNY ZAVOD BIOKHIMICHESKIKH PREPARATOV) 8 janvier 1982, voir revendications; exemple -----	2-5
<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: x-small;"> <div> <p>* Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cite pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
30 juillet 1986	28 AUG 1986	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé M. VAN MOL	

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE RELATIF

A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO. PCT/FR 86/00195 (SA 13419)

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche international visé ci-dessus. Lesdits membres sont ceux contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 13/08/86

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
FR-A- 2044588	19/02/71	Aucun	
GB-A- 1581832	31/12/80	Aucun	
FR-A- 373828		Aucun	
FR-A- 2486097	08/01/82	JP-A- 56169591	26/12/81
		DE-A, C 3115516	11/02/82
		GB-A, B 2076018	25/11/81
		US-A- 4380583	19/04/83

Pour tout renseignement concernant cette annexe :
voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No. 12/82